REVISED PROCEDURES FOR ADJUSTING SALINITY OF EFFLUENT SAMPLES FOR MARINE SUBLETHAL TOXICITY TESTING CONDUCTED UNDER ENVIRONMENTAL EFFECTS MONITORING (EEM) PROGRAMS

Method Development and Applications Section
Environmental Technology Centre
Environment Canada

December 2001

REVISED PROCEDURES FOR ADJUSTING SALINITY OF EFFLUENT SAMPLES FOR MARINE SUBLETHAL TOXICITY TESTING CONDUCTED UNDER ENVIRONMENTAL EFFECTS MONITORING (EEM) PROGRAMS

1.0 *Application*

The following procedures for adjusting the salinity of samples of effluent are now recommended by Environment Canada when performing toxicity tests consistent with EEM effluent monitoring requirements for facilities discharging to the marine environment. They are intended for use with effluent samples evaluated for sublethal toxicity using:

(a) the 7-day larval survival-and-growth test with the inland silverside fish *Menidia beryllina*, performed according to Section 13 of USEPA (1994);

(b) the 7-day larval survival-and-growth test with the topsmelt fish, *Atherinops affinis*, performed according to Section 11 of USEPA (1995);

(c) the fertilization assay using echinoids (sea urchins or sand dollars), performed according to the amended (November 1997) version of EC (1992); and

(d) the sexual reproduction test using the red macroalga *Champia parvula*, performed according to Section 16 of USEPA (1994).

These procedures supersede and replace the earlier procedure recommended by Environment Canada (EC, 1997) for salinity adjustment of effluent samples intended for marine sublethal toxicity tests under the EEM program.

2.0 *Rationale*

A recently-published study (Jonczyk *et al.*, 2001) has shown that, using Environment Canada□s echinoid fertilization assay (EC, 1992), the sublethal toxicity of a number of samples of industrial effluent did not differ when their salinity was adjusted by either the direct addition of dry salt or hypersaline brine (HSB) to the samples. This study also showed that sample toxicity was similar when either artificial seawater or natural seawater was used as the control/dilution water in the test. These findings, together with a desire to enable testing of the sublethal toxicity of effluent samples at concentrations up to and including 100% (i.e., undiluted effluent), has resulted in a revisiting of Environment Canada=s existing guidance for adjusting salinity for marine sublethal toxicity tests performed under Environmental Effects Monitoring (EEM) programs (EC, 1997).

Following are revised procedures for salinity adjustment, now recommended by Environment Canada for this purpose. These revised procedures offer additional options for adjusting the salinity of effluent samples as well as the associated control/dilution water used for the sublethal toxicity test. Depending on the options chosen, sample toxicity may now be determined at concentrations up to and including 100%.[1] Also, these revised procedures now offer the option of using artificial seawater (prepared using artificial HSB or by the addition of dry salt directly to deionized or other water) as the control/dilution water.[2]

3.0 *Test Salinity*

The purpose of this guidance is to provide direction on the adjustment of salinity in effluent to be assessed for potential sublethal effects on marine organisms under an EEM program. For any or all of the above biological test methods identified for effluent testing and referenced herein (see Sections 1.0 and 7.0 of this guidance), a test salinity of 30 ∀ 21 is to be used. Therefore, all test solutions must be within the range of 28 to 321 throughout the test.[3]

4.0 *Adjusting Salinity of Effluent Samples*

The salinity of each effluent sample used in any of the toxicity tests identified herein in Section 1.0 must be adjusted to 30 ∀ 21 (i.e., the test salinity; see Section 3.0) before test concentrations are prepared. Two approaches are available for this purpose: (1) sample salinity may be adjusted by the direct addition of dry salt to the effluent; or (2) sample salinity may be adjusted by the addition of hypersaline brine (HSB). In each instance, sample salinity should be adjusted as soon as possible

---

[1] Using the procedure for adjusting sample salinity recommended in EC (1997), i.e., the addition of a quantity of 90 ∀ 11 HSB to the effluent sufficient to raise sample salinity to 30 ∀ 21, the highest effluent concentration that could be included in a multi-concentration toxicity test would be ~70% if the salinity of the sample were 01.

[2] The earlier guidance (EC, 1997) recommended that HSB should be prepared using a source of uncontaminated natural seawater, and that this (natural) HSB should be used both as the control/dilution water and for adjusting sample salinity.

[3] Two of the four marine toxicity tests under consideration here (i.e., the fertilization assay with echinoids according to EC 1992; and the *Champia* sexual reproduction test according to Section 16 of USEPA 1994) specify that the test salinity is to be 30 ∀ 21. The other two biological test methods (i.e., the two larval survival-and-growth tests using inland silverside fish or topsmelt fish) indicate that test salinity must be within the range of 5 to 321 (see Section 13 in USEPA, 1994) or 5 to 341 (see Section 11 in USEPA, 1995), with all replicate solutions within ∀ 21 of the selected test salinity. For purposes of the EEM program, and in order to establish a standard approach for adjusting the salinity of effluent samples that could be applied to each of the four marine toxicity tests, we have chosen a test salinity of 30 ∀ 21 for each of the four toxicity tests applied as part of this program.

following the receipt of the effluent in the laboratory.[4] The sample must not be warmed to the test temperature before this salinity adjustment. Rather, the temperature during salinity adjustment should approximate either that of the sample when received, or, in instances where the effluent is stored overnight (in which case it must be held in a refrigerator at 4 ∀ 2EC), that of the effluent upon its removal from the refrigerator.

If the first approach is chosen, either a mixture of commercially-available dry ocean salts[5] or reagent-grade salts[6] may be added to the undiluted effluent sample, in a quantity sufficient to raise sample salinity to 30 ∀ 21 (i.e., the acceptable range of salinity for each test; see Section 3.0). Any sample (or subsample) to which dry salts are added directly must be aged for a period of 16 to 24 hours before use (or, in the case of a static-renewal test, first use[4]) in a toxicity test.[7] To age the sample, the required quantity of salt must be added while stirring the effluent; thereafter, the salinity-adjusted (30 ∀ 21) sample must be held for 16 to 24 h at 4 ∀ 2EC in the dark and within a sealed container with minimal air space (and without any aeration) (Jonczyk *et al.*, 2001). Sample pH should be measured

---

[4] Toxicity tests performed using larval inland silverside fish according to Section 13 in USEPA (1994), or larval topsmelt fish according to Section 11 in USEPA (1995), are static-renewal tests that require the daily renewal of each test solution throughout the 7-day test period. If either of these toxicity tests is conducted using a single sample of effluent that is held (as subsamples) at the testing laboratory in three separate containers (i.e., subsample 1 used for Days 0, 1, and 2; subsample 2 used for Days 3 and 4, and subsample 3 used for Days 5, 6, and 7), the salinity of each subsample must be adjusted just before that aliquot is readied for its first use in the test. If effluent salinity is to be adjusted by the addition of dry salts, the salts must be added just before the aging period of 16 to 24 h preceding the first use of that subsample in the toxicity test. If effluent salinity is to be adjusted by the addition of natural or artificial HSB, the brine must be added just before the first use of that subsample in the toxicity test.

[5] Commercially-available mixtures of dry sea salts include products marketed in aquarium supply stores under trade names such as Instant Ocean™, Forty Fathoms™, and HW Marinemix™ (EC, 1992; Neiheisel and Young, 1992; USEPA, 1994, 1995; Jonczyk *et al.*, 2001). Both Neiheisel and Young (1992) and Jonczyk *et al.* (2001) reported favourable results in echinoid (sea urchin) fertilization assays performed using Instant Ocean™ for adjusting sample salinity and for preparing the control/dilution water. Testing laboratories should obtain the Abest quality@ of commercial sea salts (e.g., Forty Fathoms™ Toxicity Test Grade) available from the supplier, and should evaluate its ability to meet the test-validity requirements in preliminary toxicity tests using such new products or batches for preparing *salt controls* (see Section 5.0).

[6] A formula for preparing artificial HSB (or artificial control/dilution water; see Section 5.0) using a mixture of reagent-grade salts dissolved in deionized water, which is referred to as Amodified GP2", has been published by Spotte *et al.* (1984) and Bidwell and Spotte (1985). This formula is also available in USEPA (1994; see Table 2 in Sections 13 and 16) and USEPA (1995; see Table 2 in Section 7).

[7] Aging samples (or subsamples; see footnote 4) of salinity-adjusted effluent for a standard period of 24 hours is recommended, in instances where this duration of aging is manageable without requiring evening work. However, the aging period may be reduced to as little as 16 hours when the sample is already 2 days old upon receipt at the laboratory, and the sample arrives in the late afternoon. In such an instance, and to enable the maximum acceptable interval of 3 days between time of sampling and time of test initiation to be met (EC, 1992; USEPA, 1994, 1995), the aging period (to enable chemical equilibration of the salinity-adjusted effluent) may be limited to as little as 16 hours. In any event, the sublethal toxicity test must be started within 3 days of sample collection.

and recorded before salt addition and after salt addition but before aging.[8] Following this aging period, the effluent sample should be stirred, warmed to the test temperature (see EC 1992; USEPA 1994, and USEPA 1995), its pH checked and recorded[8], test concentrations prepared (see Section 5.0), and the toxicity test started.

If the second approach is chosen, sample salinity must be adjusted to the test salinity (30 ∀ 2‰) by the addition of the required amount of hypersaline brine (and, as necessary, deionized water). Hypersaline brine (HSB) adjusted to a final salinity of 90 ∀ 1‰ must be used for this purpose.[9] This can be made by concentrating an uncontaminated supply of natural seawater by freezing or evaporation; or by the addition of commercial sea salt (e.g., Instant Ocean™)[5] or an appropriate mixture of reagent-grade salts (e.g., ?modified GP2"; see Spotte *et al.*, 1984; Bidwell and Spotte 1985; Table 2 in Sections 13 and 16 of USEPA 1994; or Table 2 in Section 7 of USEPA 1995), in a quantity sufficient to attain a salinity of 90 ∀ 1‰. Guidance for the preparation of natural HSB by freezing or evaporation is provided in Environment Canada (1992) and USEPA (1994, 1995) and has been summarized below.

To prepare natural hypersaline brine, high quality (and preferably high salinity) natural seawater should be filtered to at least 10 µm before placing it into the freezer or the evaporation chamber. If HSB is prepared by freezing, freeze at -10 to -20EC for ∃6 h, and collect the HSB under the ice when it reaches a salinity of 90 ∀ 1‰ (EC, 1992; USEPA, 1995). If HSB is prepared by evaporation, heat the natural seawater in a non-corrosive, nontoxic container at #40EC while aerating it, until the desired salinity (i.e., 90 ∀ 1‰) is achieved. Regardless of which technique is used (i.e., freezing or

---

[8] The intent of these measurements is to determine and record the extent to which the salt addition changes sample pH. When considered alongside the pH of the effluent at the time that test solutions are prepared (see below), an understanding is gained of the effects of the salt addition and the subsequent aging on sample pH. This information is useful in determining the effects of these manipulations on sample integrity, and when interpreting the results of the toxicity test. It is well known that changes in sample pH can have a marked influence on sample toxicity. Conceivably, certain salt formulations used to adjust sample pH could alter its pH from that which would result if natural HSB were used to adjust sample salinity or upon the mixing of the effluent in natural seawater. A comparison of pH values measured upon the addition of salt to the effluent and following the subsequent period of 16-24 h for aging also provides insight into the changes in sample chemistry during this period.

[9] Although USEPA (1994, 1995) specify that solutions of hypersaline brine can be prepared at a range of salinities up to and including 100‰, Environment Canada has chosen a final salinity of 90 ∀ 1‰ for HSB (natural or artificial) to avoid overshoots which could result in problems due to salt precipitation. During its preparation, the salinity of HSB may increase to as high as 100‰, although exceeding this limit must be avoided and the final salinity must be adjusted to within the range of 90 ∀ 1‰ by the addition of the appropriate volumes of deionized water, natural seawater, or HSB with a lower salinity. For a test salinity of 30‰, the use of HSB with a final salinity of 90 ∀ 1‰ effectively reduces the highest test concentration from 70% effluent (if a 100‰ solution of hypersaline brine were used) to 67% (using a 90‰ solution of hypersaline brine) (EC, 1992; USEPA, 1994).

evaporation), the salinity of the brine should be monitored during its preparation, and must not exceed1001 while being prepared.[9] After the required salinity for HSB (i.e., 90 ∀ 11) is achieved, the natural HSB should be passed through a filter with pore size #1 µm (USEPA, 1994, 1995) and poured into containers (e.g., 20-L collapsible polyethylene or polycarbonate water jugs).

Each container should be filled, capped, and labelled with the salinity of the HSB and the date the brine was generated. Freshly-prepared natural HSB may be used to adjust sample salinity (or as the control/dilution water; see Section 5.0) as soon as it has been prepared, or it may be stored in the dark at 4EC until required. Experience has shown that storage of up to several months under these conditions is acceptable (USEPA, 1994, 1995).

Any artificial hypersaline brine prepared using commercial sea salt (e.g., Instant Ocean™) or reagent-grade salts (e.g., ?modified GP2") must be filtered (#1 µm), and then aerated vigorously for a minimum of 24 h before use. Thereafter, unused portions should be capped and stored in the dark at 4 ∀ 2EC until used. Hypersaline brine is usually of acceptable quality even after several months in storage (USEPA, 1995).

If dry salt is added directly to the effluent sample according to the first approach described herein, the sublethal toxicity test can and should include a test concentration of 100% effluent. Using the second approach described herein, i.e., the addition of hypersaline brine (natural or artificial) with a salinity of 90 ∀ 11 to the undiluted sample, the maximum concentration of effluent that can be prepared and tested at a salinity of 301 is 67% v/v if the effluent has an initial salinity of 01 (EC, 1992). Accordingly, it is recommended that any sublethal toxicity test performed with effluent adjusted to a salinity of 30 ∀ 21 using HSB (natural or artificial) should include a test concentration of 67% effluent (i.e., the highest test concentration achievable using HSB) as well as other (lower) concentrations.

5.0 *Control/Dilution Water*

Control/dilution water (i.e., seawater used for the set of *dilution-water control* solutions included in the toxicity test and as the dilution water used to prepare each effluent concentration included in the test) must be adjusted to the test salinity (i.e., 30 ∀ 21) before its use. One of any of the following approaches may be used to prepare the control/dilution water: (1) artificial seawater is made up to the test salinity by adding the appropriate amount of commercially-available dry ocean salts (e.g., Instant Ocean™) or reagent-grade salts (e.g., modified GP2) to deionized water; (2) appropriate quantities of natural or artificial hypersaline brine and deionized water are mixed together; (3) a supply of uncontaminated natural seawater with a salinity of 30 ∀ 21 is used; or (4) a supply of uncontaminated natural seawater with a lower (i.e., <281) or higher (i.e., >321) salinity is mixed with the appropriate

amount of dry ocean salts, reagent-grade salts, natural HSB, artificial HSB, or deionized water sufficient to adjust its salinity to within the test range. A given batch of dilution water (natural or artificial) should not be used for more than 14 days following preparation, during which time its container should be kept covered and the contents protected from light (USEPA, 1994, 1995). During prolonged (>1 day) storage, natural or artificial seawater prepared for use as dilution water should be refrigerated (4 ∀ 2EC) to minimize microbial growth.

Any control/dilution water prepared by the addition of commercially-available dry ocean salts (e.g., Instant Ocean™) or reagent-grade salts (e.g., modified GP2) to deionized or other water (e.g., natural seawater with a salinity <281) must be mixed thoroughly during the salt addition. Thereafter, the mixture (with a salinity of 30 ∀ 21) must be aerated vigorously for a minimum of 24 h (USEPA, 1994, 1995) before its use.

Any control/dilution water prepared by the addition of natural HSB to deionized or other water (e.g., natural seawater with a salinity <281) must be made up following the directions in Section 4.0 for the preparation and storage of natural HSB. The mixture (with a salinity of 30 ∀ 21) may be used to prepare the controls and the test concentrations once the required test salinity and test temperature (see EC, 1992; USEPA, 1994; and USEPA, 1995) has been achieved; and after aerating the test water to achieve a dissolved oxygen concentration within the range of 90 to 100% saturation.

Any control/dilution water prepared by the addition of artificial HSB to deionized or other water (e.g., natural seawater with a salinity <281) must be made up following the directions in Section 4.0 for the preparation and storage of artificial HSB. Any artificial HSB used for this purpose must be filtered (#1 μm), and then aerated vigorously for a minimum of 24 h before use.

Any control/dilution water prepared using natural seawater (salinity 30 ∀ 21) alone should be filtered, aerated, and stored as necessary, using the guidance provided in the respective test method document (EC, 1992; USEPA, 1994, 1995). Before use, the quantity (including a surplus) of natural seawater to be used as control/dilution water in the sublethal toxicity test must be adjusted to the test temperature, and aerated to within 90 to 100% of the saturation value for dissolved oxygen at that test temperature and salinity.[10]

Each toxicity test identified in Section 1.0 must include one or more complete sets of replicate control solutions. For any test whereby commercially-available dry ocean salts (e.g., Instant Ocean™) or reagent-grade salts (e.g., "modified GP2") is added directly to the effluent sample to adjust its salinity

[10] Saturation values for dissolved oxygen (DO) are dependent on both the temperature and the salinity of the water (or effluent). A standard table of DO values versus temperature and salinity should be consulted.

to 30 ∀ 21 (see Section 4.0), a set of replicate control solutions (i.e., A*salt controls*@) must be included in the test which is prepared using the same source, batch, and concentration of dry salts as that added to the effluent sample. Similarly, for any test whereby natural or artificial hypersaline brine is added to the effluent sample to adjust its salinity (see Section 4.0), a set of replicate control solutions (i.e., @*HSB controls*A) must be included in the test which is prepared using the same source, batch, and concentration of HSB as that added to the effluent sample. The salinity of these replicate control solutions must be 30 ∀ 21 when they are prepared.

For any test whereby the dilution water differs from the control water described in the preceding paragraph[11], a second set of control solutions (i.e., A*dilution-water controls*") must be prepared using a portion of the same batch of dilution water as that used to prepare the test concentrations of the effluent sample. The salinity of this second set of replicate control solutions must be 30 ∀ 21 when they are prepared.

The results for each set of *salt controls*, *HSB controls*, or *dilution-water controls* used in a toxicity test must be examined to determine if they independently meet the test-specific criterion or criteria for test validity (see EC 1992, Section 4.5.1; USEPA 1994, Sections 13.12 and 16.11; and USEPA 1995, Section 11.12). In instances where two sets of control solutions are used (i.e., *salt controls* or HSB *controls* as well as *dilution-water controls*), the results for the toxicity test are considered to be valid and acceptable only if each set of control solutions independently met the respective validity requirement(s).[12]

For any toxicity test which includes a set of *salt controls* or a set of *HSB controls*, as well as a set of *dilution-water controls*, and where responses in both controls have met the test-specific validity

---

[11] Examples of situations where the dilution water differs from the control water described in the preceding paragraph include the following situations: (a) dry salts are used to adjust the salinity of the effluent sample, and a supply of uncontaminated natural seawater with a salinity of 30 ∀ 21 is used as the dilution water; (b) dry salts are used to adjust the salinity of the effluent sample, and a mixture of natural seawater and HSB (artificial or natural) with a final salinity of 30 ∀ 21 is used as the dilution water; (c) dry salts are used to adjust the salinity of the effluent sample, and a mixture of deionized water and HSB (artificial or natural) with a final salinity of 30 ∀ 21 is used as the dilution water; (d) HSB (artificial or natural) is used to adjust the salinity of the effluent sample, and a supply of uncontaminated natural seawater with a salinity of 30 ∀ 21 is used as the dilution water; and (e) HSB (natural or artificial) is used to adjust the salinity of the effluent sample, and a mixture of natural seawater and HSB (artificial or natural) with a final salinity of 30 ∀ 21 is used as the dilution water. In each of these (or any other) instances where the dilution water differs from the control water described in the preceding paragraph, a second set of control solutions must be prepared using 100% dilution water (salinity, 30 ∀ 21) only.

[12] For the results of any toxicity test which includes two sets of controls (i.e., a *salt control* and a *dilution-water control*, or an *HSB* control and a *dilution-water control*) to be considered as valid and acceptable, both controls must independently meet the criterion or criteria for test validity. Pooling control data for these two sets of controls before judging if the test results are valid or not is an unacceptable approach, since this pooling could in some instances mask an unacceptable set of control results.

criterion or criteria of the test, the following requirement applies. The results for the two sets of control solutions must be pooled before calculating any statistical endpoints involving comparisons of the findings for each set of test concentrations versus those for control solutions.[13]

6.0 *Expressing, Applying, and Reporting Test Concentrations*

Expressing, applying, and reporting test concentrations (% v/v) used in a sublethal toxicity test whereby effluent salinity is adjusted by the addition of dry salts (Section 4.0) is straight forward and routine, in that the 100% and lower effluent concentrations used in the toxicity test are not materially altered by the addition of the dry salts. For a test whereby effluent salinity is adjusted by the addition of an aqueous solution of natural or artificial hypersaline brine, this is less straightforward since the addition of the brine to the effluent dilutes the sample (and its test concentration) in direct proportion to the volume of brine added.[14]

In any instance where effluent salinity is adjusted by the addition of artificial or natural HSB (see Section 4.0), laboratory personnel must keep in mind that the concentration of the effluent sample has been reduced from full strength by the addition of hypersaline brine for salinity adjustment. Accordingly, any subsequent dilutions of the effluent sample using dilution water must be multiplied by this required dilution with HSB, before expressing, applying, and reporting the test concentrations.[14] Actual test concentrations (based on these calculations) should also be included when (or if) test concentrations are identified on test chambers, and when entering observations and results for each test concentration on bench sheets and estimating endpoint results (e.g., LC50 and/or ICp).

---

[13] For a test which involves both a *salt control* or *HSB control* and a *dilution-water control*, pooling the data for the two sets of control solutions makes sense from a biological standpoint, since the test organisms held in a range of concentrations of the effluent sample would be exposed to each of these test solutions. The *salt control* or *HSB control* best represents the 100% concentration as well as other concentrations >50% effluent. The *dilution-water control* best represents test concentrations <50% (although it is represented by any concentration involving dilution of the effluent). Simple pooling of the data for the two sets of control solutions integrates effectively the combined influence of the salt or HSB added to the effluent sample to adjust salinity, as well as the influence of the (differing) dilution water used in the test.

[14] Following the adjustment of the salinity of a (freshwater) sample of effluent to 30‰ using 90‰ HSB, the concentration of effluent in this sample will be 67% (see Section 4, including footnote 9). Accordingly, each subsequent dilution of this salinity-adjusted sample must be multiplied by the sample=s salinity-adjusted concentration to derive the test concentrations. For example, test concentrations for a dilution series involving 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, and 3.1% of the salinity-adjusted sample of effluent would be 67%, 33.5%, 16.8%, 8.4%, 4.2%, and 2.1%, respectively, of the original effluent sample. These latter concentrations represent the ones to be reported.

7.0 *Acknowledgements*

This procedural document was written by D. McLeay (McLeay Environmental Ltd., Victoria, BC), under the direction of R. Scroggins (Method Development and Applications Section, Environment Canada, Ottawa, ON). The assistance of E. Jonczyk (BEAK International Ltd., Brampton, ON), who provided technical input and unpublished data that helped guide the preparation of these revised procedures for salinity adjustment, is gratefully acknowledged. The following persons are thanked for providing review comments in response to a draft of this technical guidance document: K. Doe (Atlantic Environmental Science Centre, Environment Canada, Moncton, NB); J. Elphick (EVS Environment Consultants, North Vancouver, BC), E. Jonczyk (BEAK International, Brampton, ON); M. Moody (Saskatchewan Research Council, Saskatoon, SK); C. McPherson (EVS Environment Consultants, North Vancouver, BC), and J. Pickard (BC Research Inc., Vancouver, BC).

8.0 *References*

Bidwell, J.P. and S. Spotte (1985). *Artificial Seawaters, Formulas and Methods*, Jones and Bartlett Publ. Inc., Boston, MS.

EC (1992). Biological Test Method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars, 97 p., Report EPS 1/RM/27 including November 1997 Amendments, Environmental Protection Series, Environment Canada, Ottawa, ON.

EC (1997). Recommended Procedure for Adjusting Salinity of Effluent Samples for Marine Sublethal Toxicity Testing Conducted Under Environmental Effects Monitoring (EEM) Programs, 5 p., July 1997 Technical Report, Method Development and Applications Section, Environment Canada, Ottawa, ON.

Jonczyk, E., G. Gilron, and B. Zajdlik (2001). Sea Urchin Fertilization Assay: An Evaluation of Assumptions Related to Sample Salinity Adjustment and Use of Natural and Synthetic Marine Waters for Testing, *Environ. Toxicol. Chem., 20*: 804-809.

Neiheisel, T.W. and M.E. Young (1992). Use of Three Artificial Sea Salts to Maintain Fertile Sea Urchins (*Arbacia punctulata*) and to Conduct Fertilization Tests with Copper and Sodium Dodecyl Sulfate. *Environ. Toxicol. Chem., 11*: 1179-1185.

Spotte, S., G. Adams, and P.M. Bubucis (1984). GP2 As an Artificial Seawater for Culture or Maintenance of Marine Organisms, *Zool. Biol., 3*: 229-240.

USEPA (1994). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms (Second Edition), 483 p., Report EPA/600/4-91/003, July 1994, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

USEPA (1995). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms, 661 p., Report EPA/600/R-95/136, August 1995, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

PROCÉDURE RÉVISÉE POUR L'AJUSTEMENT DE LA SALINITÉ D'ÉCHANTILLONS D'EFFLUENTS SOUMIS À UN ESSAI DE TOXICITÉ SUBLÉTALE EN MILIEU MARIN CONDUIT DANS LE CADRE DES PROGRAMMES D'ÉTUDE DE SUIVI DES EFFETS SUR L'ENVIRONNEMENT (ESEE)

Section de l'élaboration des méthodes et des applications
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada

Décembre 2001

PROCÉDURE RÉVISÉE POUR L'AJUSTEMENT DE LA SALINITÉ D'ÉCHANTILLONS D'EFFLUENTS SOUMIS À UN ESSAI DE TOXICITÉ SUBLÉTALE EN MILIEU MARIN CONDUIT DANS LE CADRE DES PROGRAMMES D'ÉTUDE DE SUIVI DES EFFETS SUR L'ENVIRONNEMENT (ESEE)

1.0 *Application*

Environnement Canada recommande dorénavant de suivre les procédures suivantes pour l'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents devant servir à des essais de toxicité conduits conformément aux exigences des programmes d'étude de suivi des effets sur l'environnement (ÉSEE) pour les installations qui évacuent leurs rejets en milieu marin. Ces procédures sont applicables lors d'évaluation de la toxicité sublétale d'échantillons d'effluents au moyen des essais suivants :

(a) The 7-day larval survival-and-growth test with the inland silverside fish *Menidia beryllina* (Essai de survie et de croissance sur 7 jours avec des larves de *Menidia beryllina*), exécuté selon le protocole décrit à la section 13 des méthodes de l'USEPA (1994).

(b) The 7 day larval survival-and-growth test with the topsmelt fish *Atherinops affinis* (Essai de survie et de croissance sur 7 jours de larves de Capucettes barrées *Atherinops affinis)*, exécuté selon le protocole décrit à la section 11 des méthodes de l'USEPA (1995).

(c) Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats), exécuté selon le protocole d'Environnement Canada (1992), modifié en novembre 1997.

(d) The sexual reproduction test using the red macroalga *Champia parvula* (Essai de reproduction avec la macroalgue rouge *Champia parvula*), exécuté selon le protocole décrit à la section 16 des méthodes de l'USEPA (1994).

Ces procédures annulent et remplacent celles recommandées auparavant par Environnement Canada (EC, 1997) pour l'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents devant servir à des essais de toxicité sublétale en milieu marin conduits conformément aux programmes d'étude de suivi des effets sur l'environnement.

2.0 *Bien-fondé*

L'étude de Jonczyk *et al.* (2001) récemment publiée a montré que lorsqu'on conduisait un essai de fécondation chez des oursins selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1992), la toxicité sublétale de nombreux échantillons d'effluents industriels ne variait pas lorsque leur salinité était ajustée soit par l'ajout direct de sels secs ou l'ajout de saumure hautement concentrée (SHC). L'étude a de plus démontré que l'utilisation d'eau de mer artificielle ou d'eau

de mer naturelle comme eau de contrôle/de dilution n'influençait en rien la toxicité de l'échantillon. Ces résultats, joints au désir de pouvoir conduire des essais de toxicité sublétale d'échantillons d'effluent de concentrations allant jusqu'à 100 % (c.-à-d., effluent non dilué), nous ont incité à revoir les lignes directrices actuelles d'Environnement Canada pour l'ajustement de la salinité en vue d'essais de toxicité sublétale en milieu marin conduits conformément aux programmes d'étude de suivi des effets sur l'environnement (ÉSEE) (EC, 1997).

Les procédures révisées d'ajustement de la salinité maintenant recommandées par Environnement Canada sont présentées dans les paragraphes qui suivent. Ces procédures révisées offrent d'autres alternatives pour l'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluent et de l'eau de contrôle/de dilution utilisés pour les essais de toxicité sublétale. Selon les alternatives choisies, la toxicité d'un échantillon peut maintenant être déterminée aussi bien avec l'échantillon d'effluent non dilué (100 % d'effluent) qu'à des concentrations plus faibles.[1] De plus, il est maintenant possible d'utiliser de l'eau de mer artificielle (préparée au moyen de SHC ou par l'ajout direct de sel sec à de l'eau déionisée ou autre) comme eau de contrôle/de dilution.[2]

3.0 *Salinité de la solution d'essai*

Nous donnons ici la marche à suivre pour ajuster la salinité d'un effluent soumis à l'évaluation des effets sublétaux potentiels chez des organismes marins, conformément au programme d'étude de suivi des effets sur l'environnement. Quelle que soit la méthode d'essai biologique identifiée dans le présent document pour l'analyse d'effluents (voir sous-sections 1.0 et 7.0), la salinité d'essai doit être de 30 ± 2 ‰. Par conséquent, la gamme de salinité de toutes les solutions d'essai et tout au long de l'essai doit s'établir entre 28 et 32 ‰.[3]

4.0 *Ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents*

La salinité de chaque échantillon d'effluent soumis à l'un ou l'autre des essais de toxicité indiqués à la section 1.0 du présent document doit être ajustée à 30 ± 2 ‰ (soit la salinité d'essai déterminée; voir Section 3.0) avant de préparer les concentrations d'essai. Pour ce faire, on peut adopter l'une ou l'autre des deux approches proposées : (1) ajustement de la salinité par ajout

---

[1] En utilisant la procédure d'ajustement de la salinité d'un échantillon recommandée dans EC (1997), c.-à-d., l'ajout à l'effluent d'une quantité de SHC à 90 ± 1 ‰, suffisante pour porter la salinité de l'échantillon à 30 ± 2 ‰, la plus forte concentration d'effluent qui pourrait être incluse dans un essai à concentrations multiples serait de ~70 % si la salinité de l'échantillon était de 0 ‰.

[2] Les procédures publiées précédemment (EC, 1997) recommandaient que la SHC soit préparée avec de l'eau de mer naturelle non contaminée, et d'utiliser la SHC ainsi préparée aussi bien comme eau de contrôle/de dilution que pour l'ajustement de la salinité.

[3] Deux des quatre essais de toxicité en milieu marin considérés ici (Essai de fécondation chez les échinides selon la méthode d'EC 1992 et l'essai de reproduction sexuelle avec *Champia* exécuté conformément aux prodédures décrites dans la section 16 de l'USEPA 1994) précisent que la salinité de l'essai doit être de 30 ± 2 ‰. Les deux autres méthodes d'essai biologique (soit les deux essais de survie et de croissance de Capucettes barrées ou de *Menidia beryllina* au stade larvaire) spécifient que la salinité d'essai doit se trouver dans la plage de 5 à 32 ‰ (voir section 13 de USEPA, 1994) ou de 5 à 34 ‰ (voir section 11 dans USEPA, 1995), l'écart des répétitions de solution (réplicats) par rapport à la salinité d'essai déterminée étant de ± 2 ‰. Pour les fins du programme d'étude de suivi des effets sur l'environnement. et en vue d'établir une approche normalisée d'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents applicable à chacun des quatre essais de toxicité en milieu marin, nous avons choisi une salinité d'essai de 30 ± 2 ‰.

direct de sel sec à l'effluent ou (2) ajustement de la salinité par ajout de saumure hautement concentrée (SHC).

Quelle que soit l'alternative retenue, la salinité de l'échantillon devrait être ajustée le plus rapidement possible après la réception de l'effluent au laboratoire.[4] La température de l'échantillon ne doit pas être portée à celle de l'essai avant l'ajustement de la salinité. La température de l'échantillon au cours de l'ajustement de la salinité devrait plutôt être proche de celle de l'échantillon à sa réception au laboratoire ou, si l'échantillon a été entreposé pendant la nuit (dans quel cas il doit être maintenu au réfrigérateur à 4 ± 2 °C), à la température de l'effluent à la sortie du réfrigérateur.

Si l'on choisit la première alternative, on peut soit ajouter un mélange de sels de mer secs disponibles dans le commerce[5] ou des sels de qualité réactif[6] à l'échantillon d'effluent non dilué, et ce, en quantité suffisante pour porter la salinité de l'échantillon à 30 ± 2 ‰ (c.-à-d., la gamme de salinité acceptable pour chaque essai; voir section 3.0). Tout échantillon (ou sous-échantillon) auquel on ajoute directement des sels secs doit être vieilli pendant 16 à 24 h avant emploi (ou, dans le cas d'essai statique avec renouvellement, avant la première utilisation[4]) dans un essai de toxicité.[7] Pour le vieillissement de l'échantillon, il faut ajouter la quantité requise de sels tout en

---

[4] Les essais de toxicité avec des Capucettes barrées à l'état larvaire, exécutés selon le protocole décrit à la Section 13 de l'USEPA (1994), ou avec des larves de *Atherinops affinis*, exécutés selon le protocole décrit à la Section 11 de USEPA (1995), sont des essais statiques avec renouvellement quotidien de chaque solution au cours des 7 jours de l'essai. Si l'un ou l'autre de ces essais est conduit avec un seul échantillon d'effluent qui est conservé (sous forme de sous-échantillons) au laboratoire d'essai dans trois récipients distincts (c.-à-d., sous-échantillon 1 utilisé les jours 0, 1 et 2; sous-échantillon 2 utilisé les jours 3 et 4; et sous-échantillon 3 utilisé les jours 5, 6 et 7), il faut dans ce cas ajuster la salinité de chaque sous-échantillon immédiatement avant de préparer chacun des aliquots pour la mise en route de l'essai. Si l'ajustement de la salinité de l'échantillon est fait par ajout de sels secs, les sels doivent être ajoutés juste avant la période de vieillissement de 16 à 24 h précédant la première utilisation de ce sous-échantillon pour l'essai de toxicité. Si l'on a opté pour l'ajustement de la salinité avec de la SHC préparée avec de l'eau de mer naturelle ou artificielle, la saumure doit être ajoutée immédiatement avant la première utilisation du sous-échantillon pour l'essai de toxicité.

[5] Les mélanges de sels de mer secs disponibles sur le marché comprennent les produits vendus dans les commerces de produits pour aquariums sous des noms commerciaux tels que Instant Ocean[MD], Forty Fathoms[MD], et HW Marinemix[MD] (EC, 1992; Neiheisel et Young, 1992; USEPA, 1994, 1995; Jonczyk *et al.*, 2001). Neiheisel et Young (1992), ainsi que Jonczyk *et al.* (2001) rapportent de bons résultats dans les essais de fécondation chez les échinides (oursins de mer) dans lesquels on avait utilisé la marque Instant Ocean[MD] pour l'ajustement de la salinité de l'échantillon et la préparation de l'eau de contrôle/de dilution. Les laboratoires d'essai devraient se procurer la « meilleure qualité » de sels de mer commerciaux (p. ex., Forty Fathoms – Qualité pour Essais) disponibles chez le fournisseur, et devraient évaluer s'ils rencontrent les exigences de validité de l'essai en conduisant des essais de toxicité préliminaires avec ce genre de nouveaux produits ou de nouveaux lots pour préparer les *témoins de sels* (voir section 5.0).

[6] Spotte *et al.* (1984) et Bidwell et Spotte (1985) ont publié une formule pour préparer une SHC avec de l'eau de mer artificielle (ou de l'eau de contrôle/de dilution artificielle; voir section 5.0) avec un mélange de sels de qualité réactif dissous dans de l'eau déionisée, appelée « GP 2 modifié ». Cette formule est également fournie par l'USEPA (1994 - voir tableau 2, sections 13 et 16; 1995 - voir tableau 2, section 7).

[7] Les échantillons d'effluent (ou sous-échantillons; voir note de bas de page 4) dont la salinité a été ajustée devraient être soumis à une période standard de vieillissement de 24 h lorsque cela s'avère possible sans avoir à travailler le soir. Cette période de vieillissement peut cependant être ramenée à 16 h si l'échantillon a déjà deux jours à son arrivée au laboratoire et qu'il est reçu en fin d'après-midi. Dans un tel cas et afin de respecter le délai maximum de 3 jours entre la collecte de l'échantillon et la mise en route de l'essai (EC, 1992; USEPA, 1994, 1995), la période de vieillissement (pour permettre l'atteinte de l'équilibre chimique d'un effluent dont la salinité a été ajustée), peut être ramenée à 16 h. Quoi qu'il en soit, l'essai de toxicité sublétale doit être entrepris dans les 3 jours à partir de la collecte de l'échantillon.

brassant l'échantillon, après quoi l'échantillon d'effluent dont la salinité a été ajustée à 30 ± 2 ‰ doit être gardé pendant 16 à 24 h à 4 ± 2 °C et à l'obscurité, dans un récipient hermétiquement fermé et avec un vide d'air minimal (et sans aucune aération) (Jonczyk *et al.*, 2001). Le pH de l'échantillon devrait être mesuré et noté avant et sitôt après l'ajout du sel, mais avant le vieillissement.[8] Après le vieillissement, l'échantillon d'effluent devrait être brassé et il faudrait porter sa température à celle de la température d'essai (voir EC, 1992; USEPA 1994, 1995), mesurer et noter son pH[8], préparer les concentrations d'essai (voir section 5.0), et mettre en route l'essai.

Si l'on a choisi la deuxième alternative, la salinité de l'échantillon doit être ajustée à la salinité de l'essai (30 ± 2 ‰) par l'ajout de la quantité voulue de saumure hautement concentrée (et au besoin, d'eau déionisée). Il faut alors utiliser de la saumure hautement concentrée (SHC) ajustée à une salinité finale de 90 ± 1 ‰[9]. La saumure peut être préparée en concentrant de l'eau de mer naturelle non contaminée par congélation ou évaporation, ou par l'ajout de sels commerciaux (p ex., Instant Ocean [MD])[5] ou un mélange approprié de sels de qualité réactif (p. ex., « GP 2 modifié »; voir Spotte *et al.*, 1984; Bidwell et Spotte, 1985; tableau 2 dans les sections 13 et 16 de USEPA, 1994; ou tableau 2 de la section 7 de USEPA 1995) en quantité suffisante pour obtenir une salinité de 90 ± 1 ‰. Les instructions pour préparer de la SHC avec de l'eau de mer naturelle par congélation ou évaporation sont données dans les documents de Environnement Canada (1992) et de l'USEPA (1994, 1995) et sont résumées ci-dessous.

Pour préparer de la saumure hautement concentrée naturelle, on devrait faire passer de l'eau de mer naturelle de haute qualité (et préférablement de salinité élevée) dans un filtre d'au moins 10 µm avant la congélation ou l'évaporation. Si la SHC est préparée par congélation, congeler l'eau de mer entre -10 et -20 °C pendant ≥6 h et recueillir la saumure sous la glace lorsque la salinité a atteint 90 ± 1 ‰ (EC, 1992; USEPA, 1995). Si la SHC est préparée par évaporation, chauffer l'eau de mer à ≤ 40 °C dans un récipient résistant à la corrosion et fait d'un matériau non toxique, tout en l'aérant, jusqu'à l'obtention de la salinité souhaitée, soit 90 ± 1 ‰. Quel que soit le procédé utilisé (congélation ou évaporation), la salinité de la saumure devrait être

---

[8] Ces mesures visent à déterminer et à noterà partir de quel point l'ajout de sels modifie le pH de l'échantillon. Lorsqu'on compare ces mesures du pH au pH de l'effluent au moment de la préparation des solutions d'essai (voir ci-dessous), on peut mieux cerner les effets liés à l'ajout de sels et au vieillissement subséquent de l'échantillon sur le pH. Ces renseignements sont utiles pour déterminer les effets de ces manipulations sur l'intégrité de l'échantillon et lors de l'interprétation des résultats de l'essai de toxicité. Il est reconnu que les changements du pH peuvent fortement influencer la toxicité de l'échantillon. On peut supposer que certaines formulations de sels utilisées pour ajuster le pH de l'échantillon pourraient agir sur le pH; ce pourrait être le cas si de la SHC préparée avec de l'eau de mer naturelle était utilisée pour ajuster la salinité de l'échantillon ou lors du mélange de l'effluent dans un milieu marin naturel. Une comparaison des valeurs de pH mesuré lors de l'ajout de sels à l'effluent et après la période de vieillissement de 16 à 24 h renseigne aussi sur les changements des propriétés chimiques de l'échantillon survenus au cours de cette période.

[9] Bien que l'USEPA (1994,1995) précise que les solutions de saumure hautement concentrée peuvent être préparées dans une plage de salinité pouvant atteindre jusqu'à 100 ‰, Environnement Canada a choisi une salinité finale de 90 ± 1 ‰ pour la SHC (artificielle ou préparée avec de l'eau de mer naturelle) pour éviter des dépassements qui pourraient entraîner des problèmes dus à la précipitation du sel. En cours de préparation de la saumure, sa salinité peut augmenter jusqu'à 100 ‰; il faut toutefois éviter de dépasser cette limite et la salinité finale doit être ajustée dans la plage de 90 ± 1 ‰ par l'ajout du volume requis d'eau déionisée, d'eau de mer naturelle, ou de SHC de plus faible salinité. Pour un essai avec une solution dont la salinité est de 30 ‰, l'utilisation d'une SHC ayant une salinité finale de 90 ± 1 ‰ permet de ramener la plus forte concentration d'effluent dans la solution d'essai de 70 % (si une solution de SHC de 100 ‰ est utilisée) à 67 % (avec une solution de saumure hautement concentrée à 90 ‰) (EC, 1992; USEPA, 1994).

contrôlée au cours de sa préparation et ne doit pas dépasser 100 ‰.[9] Lorsque la SHC atteint la salinité voulue (90 ± 1 ‰), la SHC devrait être filtrée à ≤1 µm (USEPA, 1994; 1995) et versée dans des récipients (p. ex., des bonbonnes compressibles de 20 L en polyéthylène ou en polycarbonate).

Chaque récipient devrait être rempli, fermé et étiqueté en indiquant la salinité de la SHC et sa date de préparation. La saumure hautement concentrée naturelle fraîchement préparée peut être utilisée pour ajuster la salinité de l'échantillon (ou comme eau de contrôle/de dilution; voir section 5.0) dès qu'elle est prête, ou elle peut être entreposée à 4 °C à l'abri de la lumière. L'expérience a montré qu'entreposée dans ces conditions, la saumure peut être conservée pendant plusieurs mois (USEPA, 1994; 1995).

Toute saumure artificielle hautement concentrée préparée avec des sels de mer commerciaux (p. ex., Instant Ocean[MD]) ou des sels de qualité réactif (p. ex., « GP2 modifié ») doit être filtrée (mailles ≤1 µm), puis aérée vigoureusement pendant au moins 24 h avant de pouvoir l'utiliser. Par la suite, les portions de SHC non utilisées devraient être fermées et conservées à 4 ± 2 °C à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation. La qualité de la saumure hautement concentrée est généralement acceptable même après plusieurs mois d'entreposage (USEPA, 1995).

Lorsqu'on procède par ajout direct de sels secs à l'échantillon d'effluent conformément à la première alternative décrite ici, l'essai de toxicité sublétale peut et devrait comprendre une concentration d'essai à 100 % d'effluent. Avec la deuxième alternative, c'est-à-dire l'ajout à l'échantillon non dilué de saumure hautement concentrée (naturelle ou artificielle) ayant une salinité de 90 ± 1 ‰, la concentration maximale d'effluent qui peut être préparée et testée à la salinité de 30 ‰ est de 67 % v/v si l'effluent a une salinité initiale de 0 ‰ (EC, 1992). En conséquence, il est recommandé que tout essai de toxicité sublétale conduit avec un effluent dont la salinité est ajustée à 30 ± 2 ‰ avec de la SHC (naturelle ou artificielle) devrait comprendre une solution d'essai à 67 % d'effluent (soit la plus forte concentration d'essai qu'il est possible d'obtenir avec de la SHC) ainsi que des concentrations plus faibles.

5.0 *Eau de contrôle/de dilution*

La salinité de l'eau de contrôle/de dilution (c.-à-d., l'eau de mer utilisée pour la série de solutions d'eau de contrôle/de dilution soumises à l'essai de toxicité et comme eau de dilution utilisée pour préparer chaque concentration d'effluent soumise à l'essai) doit être ajustée à la salinité de l'essai (c.-à-d., 30 ± 2 ‰) avant utilisation. L'eau de dilution/de contrôle peut être préparée en adoptant l'une ou l'autre des quatre approches suivantes : (1) l'eau de mer artificielle est portée à la salinité de l'essai en ajoutant la quantité voulue de sels marins secs disponibles dans le commerce (p. ex., Instant Ocean [MD]) ou des sels de qualité réactif (p. ex., « GP2 modifié ») à de l'eau déionisée; (2) des quantités adéquates de saumure hautement concentrée naturelle ou artificielle et de l'eau déionisée sont mélangées; (3) on utilise de l'eau de mer naturelle non contaminée ayant une salinité de 30 ± 2 ‰; ou (4) de l'eau de mer naturelle non contaminée ayant une salinité inférieure (c.-à-d., <28 ‰) ou supérieure (c.-à-d., >32 ‰) est mélangée avec des sels de mer secs, des sels de qualité réactif, de la SHC naturelle, de la SHC artificielle, ou de l'eau déionisée, en quantité suffisante pour ajuster sa salinité à une valeur se situant dans la gamme d'essai. Un lot donné d'eau de dilution (naturelle ou artificielle) ne devrait pas être utilisé plus de 14 jours après sa préparation. Le récipient servant à son entreposage durant cette période devrait être fermé et gardé à l'abri de la lumière (USEPA, 1994; 1995). Lors d'entreposage

prolongé (>1 jour), l'eau de mer naturelle ou artificielle préparée pour servir d'eau de dilution devrait être réfrigérée (4 ± 2 °C) pour minimiser la croissance microbienne.

Toute eau de contrôle/de dilution préparée par ajout de sels de mer commerciaux (p. ex., Instant Ocean ^{MD}) ou de qualité réactif (p. ex., GP2 modifié) à de l'eau déionisée ou autre type d'eau (p. ex., eau de mer naturelle avec une salinité de <28 ‰) doit être brassée vigoureusement durant l'ajout du sel. Par la suite, le mélange (avec une salinité de 30 ± 2 ‰) doit être aéré vigoureusement pendant au moins 24 h (USEPA, 1994, 1995) avant son utilisation.

Toute eau de contrôle/de dilution préparée par l'ajout de SHC naturelle à de l'eau déionisée ou autre type d'eau (p. ex., eau de mer naturelle avec une salinité <28 ‰) doit être préparée conformément aux instructions données à la section 4.0 pour la préparation et l'entreposage de SHC naturelle. Le mélange (avec une salinité de 30 ± 2 ‰) peut être utilisé pour préparer les témoins et les concentrations d'essai une fois que la salinité et la température requises pour l'essai ont été atteintes (voir EC, 1992; USEPA, 1994; 1995) et après aération de la solution d'essai pour obtenir une teneur en oxygène dissous dans la plage de 90 à 100 % de saturation.

Toute eau de contrôle/de dilution préparée par ajout de SHC artificielle à de l'eau déionisée ou autre type d'eau (p. ex., eau de mer naturelle avec une salinité <28 ‰) doit être préparée en se conformant aux instructions données à la section 4.0 pour la préparation et l'entreposage de SHC artificielle. Toute SHC artificielle servant à cette fin doit être filtrée (mailles ≤1 µm) puis aérée vigoureusement pendant au moins 24 h avant emploi.

Toute eau de contrôle/de dilution préparée uniquement avec de l'eau de mer naturelle (salinité de 30 ± 2 ‰) devrait être filtrée, aérée et entreposée au besoin, en observant la marche à suivre donnée dans la méthode d'essai respective (EC, 1992; USEPA, 1994, 1995). Avant utilisation, la quantité (y compris un surplus) d'eau de mer naturelle devant servir comme eau de contrôle/de dilution dans l'essai de toxicité sublétale doit être portée à la température de l'essai et aérée jusqu'à l'obtention de 90 à 100 % de saturation pour l'oxygène dissous à la température et la salinité de cet essai.[10]

Chaque essai de toxicité indiqué à la section 1.0 doit comprendre une ou plusieurs série(s) complète(s) de répétitions de solutions de contrôle. Pour tout essai où l'ajustement de la salinité à 30 ± 2 ‰ (voir section 4.0) est fait au moyen de sels de mer secs commerciaux (p. ex., Instant Ocean ^{MD}) ou de qualité réactif (p.ex., « GP2 modifié ») ajoutés directement à l'échantillon d'effluent, une série de répétitions de solutions de contrôle (c.-à-d., « *témoins de sels* ») doit être incluse dans l'essai. Ces solutions de contrôle doivent être préparées en utilisant la même source, le même lot et la même concentration de sels secs que ceux ajoutés à l'échantillon d'effluent. Il en va de même pour chacun des essais pour lesquels on a recours à l'ajout de saumure hautement concentrée naturelle ou artificielle pour l'ajustement de la salinité de l'échantillon d'effluent (voir section 4.0). Une série de répétitions de solutions de contrôle (c.-à-d., « *témoins de SHC* ») doit être préparée en utilisant une la même source, le même lot et la même concentration de SHC que celle ajoutée à l'échantillon d'effluent. La salinité de ces répétitions de solutions de contrôle doit être de 30 ± 2 ‰ lors de la préparation.

[10] Les valeurs de saturation en oxygène dissous (OD) dépendent à la fois de la température et de la salinité de l'eau (ou de l'effluent). Un tableau standard des valeurs d'OD versus la température et la salinité devrait être consulté.

Pour tout essai dans lequel l'eau de dilution n'est pas identique à l'eau de contrôle décrite dans les paragraphes qui précèdent[11], il faut obligatoirement préparer une deuxième série de solutions de contrôle (c.-à-d., « *témoins d'eau de dilution* ») en utilisant une portion du même lot d'eau de dilution qui a servi à préparer les concentrations d'essai de l'échantillon d'effluent. La salinité de cette deuxième série de répétitions de solutions de contrôle doit être de 30 ± 2 ‰ au moment de leur préparation.

Les résultats pour chaque série de *témoins de sels*, *témoins de SHC* ou *témoins d'eau de dilution* utilisés dans un essai de toxicité doivent être étudiés pour déterminer s'ils respectent individuellement le critère spécifique à l'essai ou les critères de validité de l'essai (voir EC, 1992, section 4.5.1; USEPA, 1994, sections 13.12 et 16.11; et USEPA, 1995, section 11.12). Lorsque deux séries de solutions de contrôle sont utilisées (c.-à-d., *témoins de sels* ou *témoins de SHC* ainsi que *témoins d'eau de dilution*), les résultats de l'essai de toxicité sont considérés valides et acceptables seulement si chaque série de solutions de contrôle a individuellement satisfait aux exigences respectives de validité.[12]

Pour tout essai de toxicité comprenant une série de *témoins de sels* ou de *témoins de SHC*, ainsi qu'une série de *témoins d'eau de dilution*, et lorsque les résultats des deux témoins ont satisfait le critère de validité spécifique à l'essai ou les critères de l'essai, les exigences suivantes s'appliquent. Les résultats des deux séries de solutions de contrôle doivent être regroupés avant de calculer tout paramètre statistique comportant des comparaisons des résultats pour chaque série de concentrations d'essai en regard des résultats pour les solutions de contrôle.[13]

---

[11] Les cas où l'eau de dilution est différente de l'eau de contrôle décrite dans le paragraphe précédent peuvent notamment inclure les circonstances suivantes : (a) des sels de mer secs sont utilisés pour l'ajustement de la salinité de l'échantillon d'effluent, alors que de l'eau de mer naturelle non contaminée d'une salinité de 30 ± 2 ‰ est utilisée comme eau de dilution; (b) des sels de mer secs sont utilisés pour ajuster la salinité de l'échantillon d'effluent, et un mélange d'eau de mer naturelle et de SHC (naturelle ou artificielle) d'une salinité finale de 30 ± 2 ‰ est utilisé comme eau de dilution; (c) des sels secs sont utilisés pour ajuster la salinité de l'échantillon d'effluent, et un mélange d'eau déionisée et de SHC (naturelle ou artificielle) de salinité finale de 30 ± 2 ‰ est utilisé comme eau de dilution; (d) de la SHC (naturelle ou artificielle) est utilisée pour ajuster la salinité de l'échantillon d'effluent, et de l'eau de mer naturelle non contaminée d'une salinité de 30 ± 2 ‰ est utilisée comme eau de dilution; (e) de la SHC (naturelle ou artificielle) est utilisée pour ajuster la salinité de l'échantillon d'effluent, et un mélange d'eau de mer naturelle et de SHC (naturelle ou artificielle) ayant une salinité finale de 30 ± 2 ‰ est utilisé comme eau de dilution. Dans chacune de ces circonstances (ou toute autre) où l'eau de dilution est différente de l'eau de contrôle décrite dans le paragraphe précédent, une deuxième série de solutions de contrôle doit être préparée en utilisant *uniquement* de l'eau de dilution d'une salinité de 30 ± 2 ‰.

[12] Pour que les résultats de tout essai de toxicité qui comprend deux séries de témoins (c.-à-d., un *témoin de sels* et un *témoin d'eau de dilution*, ou un *témoin de SHC* et un *témoin d'eau de dilution*) soient considérés valides et acceptables, il faut que les deux témoins satisfassent individuellement le ou les critères de validité de l'essai. Une approche acceptable consiste à regrouper les données de ces deux séries de témoins avant de juger si les résultats de l'essai sont valides ou non, étant donné que le regroupement pourrait dans certains cas masquer une série inacceptable de résultats témoins.

[13] Pour un essai qui comprend un *témoin de sels* ou un *témoin de SHC* et un *témoin d'eau de dilution*, le regroupement des données des deux séries de solutions de contrôle est logique d'un point de vue biologique, étant donné que les organismes d'essai soumis à une gamme de concentrations de l'échantillon d'effluent seraient exposés à chacune de ces solutions d'essai. Le *témoin de sels* ou le *témoin de SHC* sont les plus représentatifs de la concentration à 100 % ainsi que des autres concentrations >50 % d'effluent. Par contre, le *témoin d'eau de dilution* est celui qui représente le mieux les concentrations <50 % d'effluent (bien qu'en fait ce soit le cas avec toute concentration comportant une dilution de l'effluent). Le simple regroupement des données des deux séries de solutions de contrôle intègre efficacement l'influence combinée du sel ou de la SHC ajoutés à l'échantillon d'effluent pour en ajuster la salinité ainsi que l'influence de l'eau de dilution (différente) utilisée pour l'essai.

6.0 *Expression, utilisation et consignation au procès-verbal des concentrations d'essai*

L'expression, l'utilisation et la consignation au procès verbal des concentrations d'essais (% v/v) utilisées dans un essai de toxicité sublétale pour lequel la salinité de l'effluent a été ajustée par l'ajout de sels secs (section 4.0) sont simples et routinières étant donné que l'effluent non dilué et les concentrations inférieures testées dans l'essai de toxicité ne sont pas affectées d'une manière appréciable par l'ajout de sels secs. Il en va autrement si l'on utilise une solution aqueuse de saumure hautement concentrée naturelle ou artificielle pour l'ajustement de la salinité, car l'ajout de saumure à l'effluent dilue l'échantillon (et sa concentration d'essai) en proportion directe avec le volume de saumure ajouté.[14]

Dans tous les cas où la salinité de l'effluent est ajustée par ajout de SHC naturelle ou artificielle (voir section 4.0), le personnel de laboratoire doit tenir compte que la concentration de l'échantillon d'effluent non dilué a été réduite par l'ajout de saumure hautement concentrée pour ajuster la salinité. Par conséquent, toute dilution subséquente de l'échantillon d'effluent avec de l'eau de dilution doit être multipliée par cette dilution requise avec de la SHC, avant d'exprimer, d'utiliser et de consigner au procès-verbal les concentrations d'essai.[14] Les concentrations d'essai réelles (basées sur ces calculs) devraient aussi être incluses lorsque (ou si) les concentrations d'essais sont identifiées sur les enceintes d'essai, et lors de la consignation des observations et des résultats pour chaque concentration d'essai sur des feuilles de travail et l'estimation des résultats (p. ex., LC50 et/ou CIp).

7.0 *Remerciements*

Cette procédure a été rédigée par D. McLeay (McLeay Environment Ltd., Vancouver, C.-B.) sous la supervision de R. Scroggins (Section de l'élaboration des méthodes et des applications, Environnement Canada, Ontario). Nous tenons à remercier E. Jonczyk (BEAK International, Brampton, Ontario) pour ses conseils techniques et les données non publiées qui nous ont aidé à préparer cette procédure révisée pour l'ajustement de la salinité. Un grand merci aux personnes suivantes pour leur contribution et leurs commentaires fort utiles suite à la révision d'une version préliminaire de ce document technique d'orientation : K. Doe (Centre des sciences environnementales, Région de l'Atlantique, Environnement Canada, Moncton, N.-B.); J. Elphick (EVS Environment Consultants, North Vancouver, C.-B.); E. Jonczyk (BEAK International, Brampton, Ontario); M. Moody (Saskatchewan Research Council, Saskatoon, Saskatchewan); C. McPherson (EVS Environment Consultants, North Vancouver, C.-B.) et J. Pickard (BC Research Inc., Vancouver, C.-B.).

---

[14] Suite à l'ajustement de la salinité d'un échantillon (d'eau douce) d'effluent à 30 ‰ par l'ajout de SHC à 90 ‰, la concentration de l'effluent dans cet échantillon sera de 67 % (voir section 4, incluant la note de bas de page 9). En conséquence, chaque dilution subséquente de cet échantillon à salinité ajustée doit être multipliée par la concentration de l'échantillon à salinité ajustée pour calculer les concentrations d'essai. Par exemple, les concentrations d'essai pour une série de dilutions allant de 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 % et 3,1 % de l'échantillon d'effluent seraient, à salinité ajustée, de 67 %, 33,5 %, 16,8 %, 8,4 %, 4,2 % et 2,1 %, respectivement, de l'échantillon d'effluent original. Ces dernières concentrations sont celles qui doivent être rapportées.

8.0 *Références*

Bidwell, J.P. et S. Spotte (1985). *Artificial Seawaters. Formulas and Methods*. Jones and Bartlett Publ. Inc., Boston, MS.

EC (1997). *Méthode recommandée pour ajuster la salinité d'échantillons d'effluents soumis à un essai de toxicité sublétale en milieu marin conduit conformément aux programmes d'études de suivi des effets sur l'environnement (ESEE)*. Rapport technique, Juillet 1997, Section de l'élaboration des méthodes et des applications, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 5 pages.

EC (1992). *Méthode d'essai biologique : Essai de fécondation chez des échinides (oursins verts et oursins plats)*. Rapport EPS 1/RM/27 comprenant les modifications apportées en novembre 1997. Collection Protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 97 pages.

Jonczyk, E., G. Gilron et B. Zajdlik (2001). Sea Urchin Fertilization Assay: An Evaluation of Assumptions Related to Sample Salinity Adjustment and Use of Natural and Synthetic Marine Waters for Testing. *Environ. Toxicol. Chem., 20* : 804-809.

Neiheisel, T.W. et M.E. Young (1992). Use of Three Artificial Sea Salts to Maintain Fertile Sea Urchins (*Arbacia punctulata*) and to Conduct Fertilization Tests with Copper and Sodium Dodecyl Sulfate. *Environ. Toxicol. Chem., 11* : 1179-1185.

Spotte, S., G. Adams et P.M. Bubucis (1984). GP2 As an Artificial Seawater for Culture or Maintenance of Marine Organisms. *Zool. Biol., 3* : 229-240.

USEPA (1995). *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms*. Report EPA/600/R-95/136, Août 1995. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

USEPA (1994). *Short-term Methods for Estimating the Chronic Troxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms (Second Edition)*. Report EPA/600-4-91/003, Juillet 1994. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH. 483 pages.